

# VARIABILITÀ GENETICA E PARENTELE INASPETTATE DEL NEBBIOLO

Anna SCHNEIDER<sup>1</sup>, Paolo BOCCACCI<sup>2</sup>, Daniela TORELLO MARINONI<sup>1</sup>, Roberto BOTTA<sup>1,2</sup>, Aziz AKKAK<sup>2</sup>, José VOUILLAMOZ<sup>3</sup>

1: CNR, Istituto di Virologia Vegetale, Unità Viticoltura, Torino

2: Dipartimento di Colture Arboree, Università di Torino

3: Istituto Agrario S. Michele all'Adige (TN) – Department of Viticulture & Enology, University of California, Davis (USA)

## **Introduzione**

Il Nebbiolo non solo è uno dei vitigni più nobili del nostro Paese, ma anche (e forse proprio per questo) uno dei primi ad essere citato, poiché a lui si riferiscono i richiami storici tra i più lontani per le varietà di vite italiane, precisamente risalenti alla seconda metà del 1200 e, in area alpina, al 1300 con il nome di Prunent (Berta e Mainardi, 1997). Una lunga tradizione culturale, dunque, per questa famosa cultivar, ma sempre in un luogo relativamente circoscritto, perché il Nebbiolo non ha mai abbandonato i sistemi collinari raccordati alle Alpi e vi ha sempre prediletto i climi montani e continentali.

Dovuta quasi certamente, almeno in parte, al lungo periodo di coltivazione, la spiccata variabilità fenotipica del Nebbiolo ha portato non solo ad assegnare a questo vitigno denominazioni diverse nei differenti luoghi di coltura (Nebbiolo maschio, femmina, fino, gentile, piccolo e grosso, oppure Spanna nel Nord Piemonte, Picotendro in Valle d'Aosta, Prunent in Val d'Ossola, Chiavennasca in Valtellina), ma anche a definire nelle Langhe alcune sottovarietà, la cui distinzione e stabilità era considerata tale da far prevedere nei disciplinari di produzione di vini prestigiosi l'impiego o l'esclusione dell'una o dell'altra. I rinomatissimi DOCG Barolo e Barbaresco devono, infatti, essere prodotti con Nebbiolo delle sottovarietà Michet, Lampia o Rosé, con l'esclusione pertanto d'altre sottovarietà un tempo più o meno diffuse, tra cui ad esempio il Nebbiolo Bolla.

Studi sono stati intrapresi sul Nebbiolo sia da un punto di vista propriamente ampelografico che genetico (Schneider *et al.*, 1991; Botta *et al.*, 2000; Schneider *et al.*, 2003). In questo lavoro sono riportati i risultati d'indagini ampelografiche e biometriche e di analisi del genoma con marcatori molecolari compiute con l'intento di stabilire la base genetica della variabilità fenotipica riscontrata nel Nebbiolo, e di studiarne i rapporti di parentela con le altre cultivar locali, al fine di chiarirne l'origine genetica e geografica.

## **Materiali e metodi**

Il materiale vegetale oggetto di osservazioni ed analisi è presente in vigneti di collezione in Piemonte e Valtellina, rispettivamente presso l'Unità di Viticoltura dell'Istituto di Virologia Vegetale del CNR di Torino e la Fondazione Fojanini di Sondrio. Le osservazioni ampelografiche sono state condotte su 33 caratteri descrittivi desunti dal Codice OIV (1983), in parte modificati. Le misure biometriche sono state eseguite su foglie adulte di genotipi diversi di Nebbiolo calcolando 16 parametri riassuntivi della morfologia fogliare (Schneider e Zeppa, 1988).

Il DNA nucleico è stato estratto da giovani germogli (seguendo il metodo proposto da Thomas e collaboratori, 1993) ed analizzato mediante marcatori SSR (*Simple Sequence Repeats*) o microsatelliti amplificando da 23 a 58 *loci*. Questi marcatori non solo si sono rivelati stabili e riproducibili (tanto da permettere lo scambio di risultati analitici tra laboratori diversi), ma per la

loro natura codominante consentono analisi genetiche di parentele e ricostruzioni di *pedigree* (Bowers e Meredith, 1997; Sefc *et al.*, 1997; Bowers *et al.*, 1999; Vouillamoz *et al.*, 2003). Le analisi sono state eseguite su gel di sequenza impiegando un sequenziatore ABI-Prism 377 con *software* Genescan, oppure mediante rivelazione del DNA con il metodo *silver staining*, come indicato da Bowers e collaboratori (1996). E' stato possibile confrontare i dati ottenuti con i due metodi dopo aver normalizzato i risultati inserendo nelle analisi genotipi noti.

## **Risultati e conclusioni**

L'esame comparativo di numerosi genotipi appartenenti a quattro importanti sottovarietà (Bolla, Lampia, Michet e Rosé) e ad alcuni sinonimi del Nebbiolo, eseguito con metodi ampelografici descrittivi e biometrici, ha indicato l'esistenza di tre principali tipi morfologici il Nebbiolo Michet, il Nebbiolo Rosé e il Nebbiolo Lampia, cui sono da ricondurre la sottovarietà Bolla ed i sinonimi, come ad esempio il Picotendro e la Chiavennasca. L'analisi del DNA mediante marcatori molecolari microsatelliti eseguita sugli stessi campioni per valutare la loro variabilità genetica ha mostrato per il Nebbiolo due diversi genotipi: il genotipo Lampia, identico al Michet e a tutti gli altri sinonimi, e il genotipo Rosé, con profilo del tutto distinto dai precedenti.

Le differenze morfo-fisiologiche riscontrate nel Nebbiolo Michet, che consistono in vigore e fertilità ridotti, scarsa resa vivaistica, internodi corti e foglie molto incise con seno peziolare molto aperto e denti allungati, si ritengono pertanto dovute all'infezione di GFLV (*Grapevine Fanleaf Virus*), che interessa tutte le viti della sottovarietà Michet non sottoposte a risanamento.

Per il Nebbiolo Rosé, le analisi genetiche non solo hanno rilevato un profilo genetico diverso, ma hanno anche indicato come molto probabile una relazione di parentela di primo grado con l'altro genotipo del Nebbiolo, perché nei 23 *loci* SSR fino ad ora analizzati i due genotipi presentano sempre almeno un allele comune. L'esistenza di varietà-popolazione nella vite, ipotizzata a livello teorico (Levadoux, 1951; Mullins e Meredith, 1989), è già stata dimostrata in Italia per la Fortana ed il Prosecco (Silvestroni *et al.*, 1997; Calò *et al.*, 2000). Per il Nebbiolo si profila una situazione analoga, benché la presenza del Nebbiolo Rosé sembra limitata al solo Albese, dove può esser derivato dall'incrocio del più diffuso Nebbiolo genotipo Lampia con un altro genitore sconosciuto, anche se allo stato attuale delle conoscenze non può essere escluso che sia lo stesso Rosé ad aver dato origine al Nebbiolo tipo Lampia. Da un punto di vista ampelografico e colturale, il Nebbiolo Rosé si distingue dal Nebbiolo Lampia per il maggiore vigore e per presentare una foglia più grande, più spessa e bollosa, con seno peziolare un po' più chiuso ed ampi seni laterali superiori, un grappolo lievemente più piccolo e più compatto, con buccia degli acini dalla sfumatura violetta; l'uva è molto zuccherina, ma meno ricca d'antociani e polifenoli.

Un'altra cultivar tipicamente piemontese, la Freisa, si è dimostrata legata da un punto di vista genetico al Nebbiolo (genotipo Lampia): la Freisa condivide con il Nebbiolo uno dei due alleli in addirittura 58 *loci* microsatelliti, tanto che una relazione di primo grado tra le due cultivar si può considerare certa. Sinonimi somiglianti (Spanna per il Nebbiolo e Spannina per la Freisa), la morfologia delle piante ed il loro modo di vegetare, nonché un simile e peculiare profilo antocianico delle uve avevano già portato ad ipotizzare una qualche parentela tra i due vitigni.

Sempre basandosi sull'analisi con marcatori molecolari microsatelliti sono proseguite le indagini volte ad individuare possibili genotipi legati da parentela con il vitigno Nebbiolo, con l'obiettivo di definirne l'origine genetica e geografica. Il DNA del Nebbiolo Lampia è stato comparato con più di 1500 varietà di viti provenienti da varie regioni del mondo (inclusi ovviamente più di un centinaio di vitigni dell'Italia Settentrionale) riuniti in un unico *database* basato su dati provenienti da: a) Università di California, Davis (C. Meredith, comunicazione personale), b) due banche dati *online* (Grape Microsatellite Collection<sup>1</sup> e Greek Vitis Database<sup>2</sup>), c)

<sup>1</sup> <http://www.ismaa.it/areadia/gmc.html>

<sup>2</sup> <http://www.biology.uch.gr/gvd/>

genotipi pubblicati recentemente non inclusi nelle precitate banche dati (Rossoni *et al.*, 2001; Crespan *et al.*, 2002; Ibanez *et al.*, 2003; Labra *et al.*, 2003; Pinto-Carnide *et al.*, 2003) e d) dati del nostro gruppo di lavoro non pubblicati. La distanza genetica tra il Nebbiolo ed ogni altra cultivar del *database* è stata calcolata in base alla proporzione d'alleli condivisi (Bowcock *et al.*, 1994).

Le otto cultivar geneticamente più vicine al Nebbiolo sono risultate nell'ordine: la Negrera (proveniente dalla Valtellina), la Freisa (diffusa in tutto il Piemonte), il Nebbiolo Rosé dell'Albese, la Vespolina (coltivata nel Nord Piemonte e nell'Oltrepò pavese), il Bubbierasco (un vecchio vitigno del Saluzzese in provincia di Cuneo), la Pignola, il Rossolino nero e la Rossola (tutte recuperate in Valtellina). In base all'analisi effettuata con da 23 a 58 *loci* SSR, per sei delle citate varietà si è dimostrata possibile una relazione di parentela di primo grado con il Nebbiolo (genotipo Lampia), nonostante qualche differenza probabilmente dovuta a mutazioni clonali (fig. 1). Ciascuna di queste cultivar, in sostanza, potrebbe corrispondere ad un genitore del Nebbiolo o alla progenie da esso derivata. Alcune ipotesi di ricostruzione del *pedigree* delle cultivar precitate e delle relazioni genetiche con il Nebbiolo sono state formulate e sono attualmente in corso di verifica mediante l'analisi con marcatori supplementari.

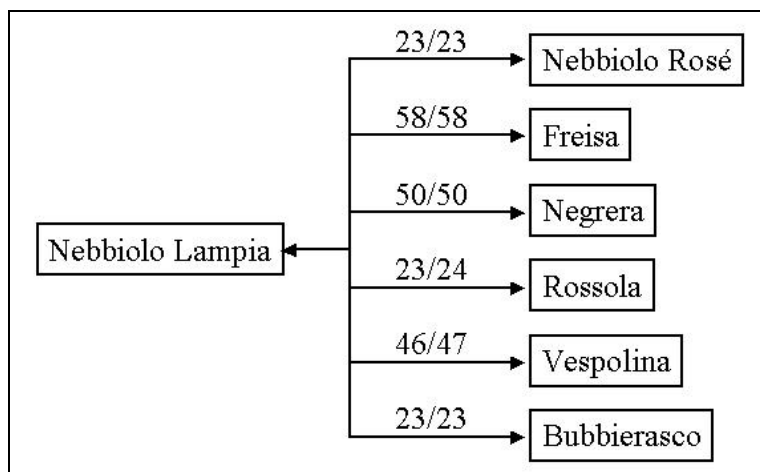


Figura 1 – Parentela di primo grado tra il Nebbiolo genotipo Lampia e sei vitigni tradizionali del Nord-Italia. Il rapporto indica il numero di marcatori microsatelliti dove la parentela è stata confermata rispetto al numero totale di *loci* analizzati.

Data la distribuzione territoriale dei vitigni geneticamente affini al Nebbiolo, tutti propri dell'Italia Settentrionale e molti dell'area alpina, si può ritenere probabile che questo nobile vitigno sia se non originario di quest'area, per lo meno da lungo tempo presente ed in modo piuttosto consistente ai piedi delle Alpi e nei sistemi collinari che si raccordano all'arco alpino. Tutto lascia pensare, in conclusione, che il Nebbiolo abbia giocato un ruolo importante nella costituzione della base genetica del germoplasma di vite proprio dell'ambiente alpino e pedemontano.

### Ringraziamenti

Gli Autori sono grati a Nello Bongiolatti della Fondazione Fojanini di Studi Superiori di Sondrio (Valtellina, Italia) e a Marco Stefanini dell'Istituto Agrario di S. Michele all'Adige (Trentino, Italia) per aver gentilmente fornito il materiale relativo ad alcune cultivar analizzate. Ringraziano inoltre il prof. Carole Meredith dell'Università di California (Davis, USA) per aver concesso l'autorizzazione all'uso del proprio *database*. Il presente lavoro è stato realizzato in parte grazie al contributo della Fondazione Cassa di Risparmio di Torino e della Swiss National Foundation for Science.

### Bibliografia

Berta P.S., Mainardi G. – 1997 – Storia regionale della vite e del vino in Italia. Piemonte. Unione Italiana Vini, Milano.

- Botta R., Schneider A., Akkak A., Scott N.S., Thomas M.R. – 2000 – Within cultivar grapevine variability studied by morphometrical and molecular marker based techniques. *Acta Hort.*, 528, 91-96.
- Bowcock, A. M., Ruiz-Linares, A., Tomfohrde, J., Minch, E., Kidd, J. R., Cavalli-Sforza, L. L. – 1994 – High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature*, 368, 455-457.
- Bowers J.E., Dangl G.S., Vignani R., Meredith C.P. – 1996 - Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat *loci* in grape (*Vitis vinifera* L.). *Genome*, 39, 628-633.
- Bowers J. E., Meredith C. P. – 1997 - The parentage of a classic wine grape, Cabernet Sauvignon. *Nature Genet.* 16, 84-87.
- Bowers J., Boursiquot J.-M., This P., Chu K., Johansson H., Meredith, C. - 1999 - Historical genetics: the parentage of Chardonnay, Gamay, and other wine grapes of Northeastern France. *Science*, 285, 1562-1565.
- Calò A., Costacurta A., Cancellier S., Crespan M., Milani N., Carraro R., Giust M., Sartori E., Anaclerio F., Forti R., Ciprian L., Di Stefano R., Pigella R., Bottero S., Gentilini N. – 2000 – Delle viti Proseccche. Libra Edizioni, Pordenone.
- Crespan, M., Calò, A., Costacurta, A., Milani, N., Giust, M., Carraro, R., Di Stefano, R. – 2002 – Cilieggiolo e Aglianicone: unico vitigno direttamente imparentato col Sangiovese. *Rivista Vitic. Enol., Conegliano* 55 (2-3), 3-14.
- Ibanez, J., Andres, M. T., Molino, A., Borrego, J. – 2003 – Genetic study of key Spanish grapevine varieties using microsatellite analysis. *Am. J. Enol. Vitic.* 54 (1), 22-30.
- Labra, M., Imazio, S., Grassi, F., Rossoni, M., Citterio, S., Sgorbati, S., Scienza, A., Failla, O. – 2003 – Molecular approach to assess the origin of cv. Marzemino. *Vitis* 42 (3), 137-140.
- Levadoux L. – 1951 – La sélection et l'hybridation chez la vigne. *Ann. Ecole Nationale d'Agriculture de Montpellier*, 28, 3-4 (1950). C. Déhan, Montpellier.
- Mullins M.G., Meredith C.P. – 1989 – The nature of clonal variation in winegrapes: a review. Proc. 7th Australian Wine Industry Technical Conference, Adelaide, Australia, 14-16 August.
- O.I.V. - 1983 - Code des caractères descriptifs des variétés et espèces de *Vitis*. A. Dedon, Paris.
- Pinto-Carnide, O., Martin, J. P., Leal, F., Castro, I., Guedes-Pinto, H., Ortiz, J. M. – 2003 – Characterization of grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars from northern Portugal using RAPD and microsatellite markers. *Vitis* 42 (1), 23-26.
- Rossoni, M., Fasoli, V., Labra, M., Spinardi, A., Failla, O., Scienza, A., Sala, F. – 2001 – Exploration of elite grapevine germplasm of Oltrepò pavese (northern Italy) using genetic, chemotaxonomic and morphological markers. *Adv. Hortic. Sci.* 15 (1-4), 72-78.
- Schneider A., Zeppa G. - 1988 - Biometria in ampelografia: l'uso di una tavoletta grafica per effettuare rapidamente misure fillometriche. *Vignevini*, 15, (9), 37-40.
- Schneider A., Mannini F., Culasso G. – 1991 – Contributo allo studio dell'eterogeneità del 'Nebbiolo': tradizione e attualità. *Quad. Vitic. Enol. Univ. Torino*, 15, 31-43.
- Schneider A., Boccacci P., Botta R. – 2003 – Genetic relationships among grape cultivars from North-Western Italy. *Acta Hort.*, 603, 229-233.
- Sefc K., Steinkellner H., Wagner H.W., Glössl J., Regner F. – 1997 - Application of microsatellite markers to parentage studies in grapevine. *Vitis*, 36 (4), 179-183.
- Silvestroni O., Di Pietro D., Intriери C., Vignani R., Filippetti I., Del Casino C., Scali M., Cresti M. – 1997 – Detection of genetic diversity among clones of cv: Fortana (*Vitis vinifera* L.) by microsatellite DNA polymorphism analysis. *Vitis*, 36, 147-150.
- Thomas M.R., Matsumoto S., Cain P., Scott N.S. – 1993 - Repetitive DNA of grapevine: classes present and sequences suitable for cultivar identification. *Theor. Appl. Genet.*, 86, 173-180.
- Vouillamoz J., Maigre D., Meredith C.P. – 2003 – Microsatellite analysis of ancient alpine grape cultivars: pedigree reconstruction of *Vitis vinifera* L. 'Cornalin du Valais'. *Theor. Appl. Genet.*, 107, 448-454.